

细菌分类学中的碱基对测定法介绍

周 慧 玲

(中国科学院微生物研究所, 北京)

近来在细菌分类学中广泛使用一种分子生物学指标来分析细菌种、属间的亲缘关系,即测定鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)在整个脱氧核糖核酸(DNA)碱基对中的克分子百分比,把它作为进行属以上分类单位划分时的依据^[1]。这是因为DNA在生物的各种性状的遗传中是起主导作用的物质,而DNA中的四种碱基,即鸟嘌呤和胞嘧啶、腺嘌呤(A)和胸腺嘧啶(T)的排列和比例是决定DNA特性的关键因素,它不受菌龄、外界环境条件的影响。在细胞内,两条互补的DNA单链中的核苷酸碱基,通过氢键被连接成碱基对,维持着DNA的双螺旋结构,这就是细菌的染色体。碱基中,总是A和T连接,G和C连接,叫做碱基对。A和T,G和C的克分子数相同。不同种的生物,其DNA中碱基对的数目和比例常常是不同的,生物种间的差别越大,它的差别也越大;反之,不同种的生物,其DNA中碱基对的数目和比例可能相同,也可能不同;而碱基对的数目和比例不相同的生物种肯定不是同一生物种。若以这四种碱基的总数作为100%时,各种细菌DNA中G-C的克分子百分比有一个比较宽的变动幅度(30%到75%)^[2],不像脊椎动物那样比较一致(40%到45%)。如两株细菌的G-C克分子百分比差别达20—30%,说明这两株菌的亲缘关系一定是较疏远的,甚而可能不是同一科内的细菌^[3]。因此可以利用G-C克分子百分比来判断系统发育中的亲缘关系。

在细菌分类中进行G-C克分子百分比的测定,与一般生物化学工作有较大的差别,首先是测定的样品往往很多,工作量大,因此使用的方法必须简便。其次是所用的材料不能选择,

不管是否适合于进行核酸的测定,都要求解决每种材料所面临的具体实验问题。例如,菌种的培养,细胞壁的破碎,干扰物质(蛋白质、多糖类、RNA等)的除去,仪器和方法的选择等。现分述如下:

试 剂

1. 含盐的EDTA 0.15M NaCl + 0.1M EDTA (乙二胺四乙酸二钠)。pH8.0, 使用EDTA及高pH都是为了抑制DNA酶活性。
2. 25% SDS (十二烷基磺酸钠)。
3. 溶菌酶 用于溶解细胞壁,使大部分革兰氏阴性菌及一部分革兰氏阳性菌溶解。
4. 5M 高氯酸钠 供给高盐浓度以便从DNA中分离蛋白质。
5. 氯仿-异戊醇 [24:1(V/V)] 氯仿使蛋白质变性,异戊醇减少泡沫,帮助分层。
6. 95% 乙醇 用于沉淀DNA。
- 7-1. 含盐的柠檬酸钠 0.15M NaCl + 0.015M 柠檬酸三钠, pH ± 2。用于维持溶解DNA溶液的离子强度及螯合二价离子。
- 7-2. 含盐柠檬酸钠稀溶液 0.015M NaCl + 0.0015M 柠檬酸三钠。DNA易溶解在这种溶液中。
- 7-3. 含盐柠檬酸钠浓溶液 1.5M NaCl + 0.15M 柠檬酸三钠。用此溶液调整上述稀溶液溶解的DNA溶液,使缓冲液浓度达到试剂7-1的浓度。
8. RNA酶(RNase) 预先溶在0.15M NaCl中(pH8.0), 80℃加热处理10分钟钝化DNA酶。用于除去样品中混杂的RNA。
9. 醋酸盐-EDTA 3.0M 醋酸钠 + 0.001M

EDTA, pH7.0,用于从溶液中分离 DNA。

10. 异丙醇 用于选择性地沉淀 DNA,必要时,可用它多处理 DNA 溶液几次,以除去多糖类杂质。

菌体培养

经过纯化后的细菌,如果是一般常见菌,可以在牛肉汁固体平皿上放置适温培养,将处于对数生长期的菌体 2—3 克,用试剂 1 离心洗涤 2—3 次(3000 次/分,5 分钟),即可备用。

破碎细胞壁

因为 DNA 的分子量很大(一般在 10^6 — 10^9 道尔顿之间^[2]),而细胞壁对于 2×10^4 道尔顿以上的大分子是不能透过的。如果不将壁破坏就不可能抽提出 DNA。

细胞壁的破坏有很多方法,一般只要把壁打开一个缝隙,即能提出 DNA,不一定要将壁破坏得十分彻底。对于一部分革兰氏阳性细菌,如某些小球菌,某些芽孢杆菌及革兰氏阴性细菌而言,可以用浓度为每毫升 0.5 毫克蛋清溶菌酶,置 37℃ 保温 30—60 分钟即可破壁。有的革兰氏阴性菌,除加溶菌酶外,还要加去污剂(如 SDS)。有不少细菌要用机械方法破坏细胞壁。例如,可以用超声波,这种仪器可由许多厂购得(例如无锡无线电专用设备厂),但是超声波对大分子的 DNA 破坏很大,所提取的 DNA 用玻棒搅不上来,必须用离心法收集。依据前人^[4]和作者^[5]的试验结果,用测定解链温度来测定 GC 克分子百分比时,可采用超声波法破壁,因为此法不受分子量大小的影响^[4]。但最好用细菌压(例如 X-压)或玻璃珠粉碎器(0.1—0.2 毫米的小玻璃珠),在振荡条件下(3000 次/分,往复式振幅为 5 厘米)处理 10 分钟左右破壁。但后两种仪器较难购得,需自行装配。

制备 DNA 的一般方法及 G-C 克分子百分比的测定方法

DNA 的提取,可用酚法^[6]或高氯酸钠法^[5],具体方法可以参考专文,这里不再赘述。

提取 DNA 后,人们常用 CsCl 的浮力密度梯度离心法或解链温度(T_m)法去测定 G-C 克分子百分比。浮力法所用样品的数量少,而且对 DNA 纯度要求也低,一次可做多个样品,优点很多,但需要超速离心机,日前在我国较难普及。而用 T_m 法测定,只要普通的紫外分光光度计和一个加热器,是一种简便可行的方法。

测定 T_m 值及 G-C 含量克分子百分比的计算

由测定 T_m 值计算 G-C 克分子百分比的方法,即所谓 T_m 值法,是依据双链的大分子 DNA 解链时共轭键拆开时出现增色性而设计的。由于 G-C 碱基对之间有三个氢键(AT 之间只有两个氢键),因此 G-C 克分子百分比愈高则解链温度也愈高。当加热到一定温度, DNA 分子在 260 毫微米处的光吸收会明显增加,即 DNA 出现增色性,在升高到某温度时,4℃ 左右的温差范围内会有 30% 左右的增色性(见图)。若将开始测定时(一般是 25℃)的光密度值定为 A_{25} ,某一温度的光密度值定为 A_t ,则将 A_t/A_{25} 为纵坐标,温度为横坐标,就可得到一个 S 形曲线,曲线的线性部分的中点,即为 T_m 值。某种细菌 DNA 的增色性曲线见图所示:

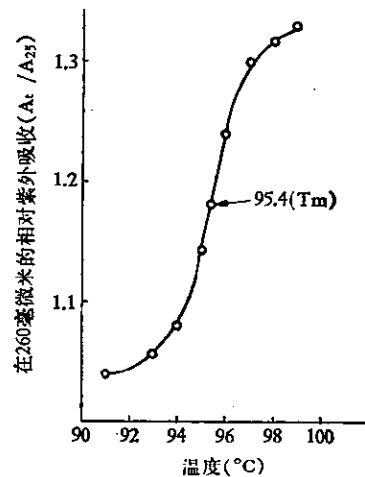


图 1 某种细菌 DNA 的增色性曲线

在进行实验时,从 25℃ 开始记录,迅速升温到约比变性温度低 5℃ 左右,然后逐度增温

直到不再呈现增色性时,可认为变性已完全,作图求出 T_m 值。在实验中要注意使测试液不达到沸腾的温度。所用温度计必须校正,校正温度控制盘与比色槽内试液温度的差额后,再进行记录。比色杯中试液蒸发引起的光密度变化,须进行校正,校正方法可参见前文及其补充^[5]。试液的损失率(L)可按下列简化近似公式计算*:

$$L = V_2 - V_1 / (T_2^2 - T_1^2)$$

其中 V_1 和 V_2 是最初和最终试液的体积, T_1 和 T_2 是室温和最终温度。

然后再求出某温度时试液的体积(V_x),可表示为:

$$V_x = V_1 - \frac{1}{2} |L| (T_x^2 - T_1^2)$$

最后根据实验值(OD)求出样品体积不变时光密度(OD_y)

因为

$$OD_y : OD = V_x : V_1$$

所以

$$OD_y = OD \cdot V_x / V_1$$

用缓冲液 7-1 时按下列经验公式计算

$$T_m = 69.3 + 0.41(G.C.)$$

即可求出 G-C 克分子百分比。例如有一铜绿假单胞菌的 DNA,其 T_m 值经测定为 96.8,则

$$GC \text{ 克分子百分比} = (96.8 - 69.3)$$

$$\times 100 / 0.41\% = 67.1\%$$

在使用以上经验公式时要注意所配制的缓冲液的离子浓度和 pH 都必须是本文所介绍的,如果用 0.01M 磷酸盐-0.001M EDTA 缓冲液时则公式如下:

$$T_m = 49.3 + 0.41(G.C.)$$

在进行 DNA 测定时,由于在 260 毫微米波长下光密度 = 1 时, DNA 含量为每毫升 50 微克,光密度值最好是 0.15—0.20 之间,所以样品大致含 DNA 量^[7]应为

50×0.15 或 $0.20 = 7.5$ 或 10 微克/毫升
过少过多都要调节。

提取的 DNA 最好当天使用,不宜放置过久。DNA 中蛋白质含量应小于 0.2—0.5%,以

免干扰。蛋白质含量可利用在 280 毫微米及 260 毫微米下的光密度差按以下公式求算浓度^[8]。

$$\text{蛋白质微克数} = 1.45 E_{280} - 0.74 E_{260}$$

然后依公式:

$$\text{蛋白质百分数} = \frac{\text{蛋白质毫克数} \times 100}{\text{蛋白质毫克数} + \text{DNA 毫克数}}$$

如所求出的蛋白质含量百分数在容许范围之内,即可进行 T_m 值测定,否则要求再次进行脱蛋白处理,以除去干扰。由于提取的 DNA 中混杂有一部分 RNA,它在 260 毫微米波长的光下也有紫外吸收,会干扰 DNA 测定,必须除去。一般除去 RNA 的方法是加 RNase^[5],但由于 RNase 中总含有微量的 DNA 酶,会降解被测试对象——DNA,因此使用 RNase 之前要进行预处理(80°C 10 分钟),由于 DNA 酶的耐热性低于 RNase 的,所以热处理十分有效(这个加热步骤很重要,温度控制要严格,否则会影响实验结果)。

比色小杯的试液应进行抽气以除去肉眼不可见的气泡,以免影响测定。

参 考 文 献

- [1] Buchanan, R. E. & N. E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th. ed., The Williams & Wilkins Company/Baltimore, 1974. Part 7: 217—285.
- [2] Davidson, T. N.: *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 6th ed. Methuen & CO. Ltd. 1969. 中国科学院微生物研究所病毒组,生物物理研究所核酸组译:核酸的生物化学,科学出版社,北京,1973,第五章。
- [3] De Ley, J. & I. W. Park: *Antonie Van Leeuwenhoek*, 32: 6—16, 1966.
- [4] Marmur, J. & P. Doty: *J. Mol. Biol.*, 5: 109—118, 1962.
- [5] 周慧玲:微生物学报, 18 (134—139), 1978.
- [6] Saito, H. & Muina, K.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 72: 619—629, 1963.
- [7] Friefelder, D.: *Physical. Biochemistry*, W. H. Freeman Co., San Francisco, 1976. Chapter, 14.
- [8] Kalekar, H. M.: *J. Biol. Chem.*, 167: 461, 1947.

* 此公式由徐浩提供。